

УДК 582.55:581.4

A. M. НУРУШЕВА¹, Н. А. ХАЙЛЕНКО², Б. М. СУЛТАНОВА¹, Н. Ж. КАДЫРОВА³

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО ПОКРОВА БЫВШЕГО СЕМИПАЛАТИНСКОГО ПОЛИГОНА: 2 – ПРОЦЕСС ФОРМИРОВАНИЯ ПЫЛЬЦЕВЫХ ЗЕРЕН У ВИДА *AGROPYRON CRISTATUM* (L) BEAUV.

¹(РГП «Институт ботаники и фитоинтродукции растений» МОН РК,²ДГП «Институт биологии и биотехнологии растений РГП «НЦБ» РК КН МОН РК,³ДГП «Институт радиационной безопасности и экологии» РГП НЯЦ РК)

Приведены данные по изучению формирования пыльцевых зерен у вида *Agropyron cristatum* (L) Beauv. – Житняк гребенчатый. Установлено, что на процессы формирования пыльцевых зерен оказывает влияние радиация, а также, вероятно, и отсутствие воды в период формирования мужского гаметофита.

Процесс индуцированного, в данном случае радиационного мутагенеза, является очень сложным и тесно связанным, прежде всего, с клеточным метаболизмом. Степень поражения радиацией генетического аппарата основывается на трех взаимосвязанных процессах: а) физических особенностях разных видов ионизирующих излучений, дающих разную микрогеометрию энергии в клетке и, в первую очередь, разную линейную потерю энергии; б) условиях в момент и после облучения; в) эволюционных, видовых и индивидуальных различий в системе естественной защиты [1]. Важны также и системы репарации в клетках, как соматических, так и в половых, которые у высших растений начинают работать сразу же, как только клетки вида попадают под излучение, т.е. с одной стороны – воздействие ионизирующего излучения на хромосомный и клеточный аппараты клетки, а с другой стороны – мощные системы репарации.

К сожалению, по Семипалатинскому полигону почти нет научных работ по радиоактивному загрязнению, по которым можно было бы провести сравнительный анализ данных, полученных 30 лет назад и современных данных. Но такие данные есть по Чернобылю, в основном, по лесным массивам. Лес может задерживать, аккумулировать и перераспределить по своим компонентам поглощенные им радионуклиды, но сам по себе не способеннейтрализовать поглощенную им радиоактивность. Ее можно частично блокировать специально построенной для этой цели динамической «биологической перегородкой» [2].

Белорусские ученые работают не только с дикорастущей флорой, но и с сельскохозяйственными угодьями, подвергшимися радионуклидному заражению. Такая работа ведется, главным образом, для практических целей – подбираются и всесторонне изучаются виды растений, способные противостоять радиоактивному загрязнению [3]; разрабатываются специальные агротехнологии и агромелиоративные мероприятия возделывания лесных культур на радиоактивно загрязненных сельскохозяйственных землях [4–7 и др.]. Во всех работах четко прослеживаются действие двух лимитирующих факторов – радиации и воды.

Однако работы по цитогенетическому изучению растений в зоне загрязнений Чернобыльской АЭС также единичны.

По мере возрастания концентрации радионуклидов в почве и семенах, прослеживается тенденция к увеличению частоты хромосомных aberrаций, нагруженности клеток, в основном фрагментами, и возрастанием частоты отставания хромосом при расхождении их к полюсам делящихся клеток. Для всех исследуемых видов дикорастущих растений из состава флоры Полесского государственного радиационно-экологического заповедника отмечено достоверное увеличение выхода aberrантных клеток по сравнению с контрольными популяциями [8]. На основании проведенных исследований автор этой работы предполагает, что выбранные виды растений могут выступать в качестве биосферных тест-систем, которые могут обеспечивать слежение за темпом мутирования в растительных популяциях

и приносить информацию о степени риска для фитоценозов, подвергшихся экологическому загрязнению.

В настоящее время также предполагают, что и у низших, и у высших организмов существуют системы *эпигенетического* контроля за проявление тех или иных признаков, как в клетке, так и в организме, в том числе и признака устойчивости к определенному виду воздействия на живой организм. Однако механизмы проявления такого эпигенетического контроля пока весьма спорны.

Материал и методы исследований

Для цитогенетических исследований был собран материал на территории бывшего Семипалатинского испытательного ядерного полигона.

Уровень МЭД	Место отбора	Координаты	
Контроль	Чайковка, предгорья Семей-тау	50°12'24,7"	79°29'11,3"
Низкий	Балапан, древнеаллювиальная равнина Шагана	49°52'14,2"	78°42'34,8"
Средний	Балапан, Атомное озеро, западная часть отвалов	49°56'15,9"	79°00'19,6"
Высокий	Балапан, Атомное озеро, северо-западная часть отвалов	49°56'12,7"	79°00'19,1"

Исследования проводили на молодых колосках и метелках, не вышедших из влагалища верхнего листа у плотнодерновинного злака житняка гребенчатого (*Agropyron cristatum* (L) Beauv), характерного сопутствующего вида в составе зональных дерновиннозлаковых (*Stipa sareptana*, *S.lessingiana*, *Festuca valesiaca*) степей.

Материал – молодые колоски и метелки, не вышедшие из влагалища верхнего листа, фиксировали в утренние часы в свежеприготовленном реактиве Карнуа (3 части 96%-ного этилового спирта: 1 часть ледяной уксусной кислоты), где и хранили 12-24 часа. Затем материал промывали в 96%-ном этиловом спирте – 1 час, 80%-ном этиловом спирте I – 1 час, 80%-ном этиловом спирте II – 1 час, 70%-ном этиловом спирте I – 1 час, 70%-ном этиловом спирте II – 1 час, 70%-ном этиловом спирте III – 1 час и оставляли на хранение в свежей порции 70%-ного этилового спирта.

Окрашивание материала – цветков и пыльников с микроспороцитами – проводили в 2%-ном растворе ацетокармина, приготовленном по стандартной методике для окраски микроспороцитов у злаков [9]. При анализе учитывали интенсивность окраски всех структур цветков и пыльников, а также подсчитывали количество клеток микроспороцитов с нормальным течением мейоза и с различными нарушениями процессов мейоза. Кроме того, подсчитывали количество normally окрашенных (фертильных) пыльцевых зерен и неокрашенных (стерильных) пыльцевых зерен в 100 полях зрения микроскопа «MICROS».

Все картины мейоза, а также цветки, пыльники и пыльцевые зерна фотографировали с помощью видеокамеры YONGXIN OPTICS CAM V200 и обрабатывали с помощью компьютерной программы YONGXIN OPTICS ScopePhoto версии 2.4.

Результаты исследований

В настоящей работе приведены данные по виду *Agropyron cristatum* (L) Beauv – Житняк гребенчатый. В таблице представлены данные по изучению пыльцевых зерен из изучаемого вида.

Характеристика пыльцевых зерен *Agropyron cristatum* (L) Beauv.

Код растения	Уровень МЭД	Количество пыльцевых зерен					
		общее		фертильных		стерильных	
		количество	количество	%	количество	%	
Г-10	Контроль						
Г-18	Низкий	5106	74	1,45	5032	98,56	
Г-16	Средний	4078	1438	35,26	2640	64,74	
Г-13	Высокий	2953	2910	98,54	43	1,44	

Г-10. Контроль. У растений вида *Agropyron cristatum*, растущих на контрольном участке бывшего Семипалатинского ядерного полигона, все пыльники и завязи в цветках хорошо развиты. Наблюдали все фазы мейоза, начиная от анафазы I и кончая формированием тетрад. Установлено, что все фазы мейоза протекают без нарушений – незначительное количество мостов наблюдали в АI – 4% и асинхронное деление в АII – 4%.

Клеток А I – 129, из них: норм. -124 -96,12%, с нарушениями (мости) - 5 – 3,88%.

Клеток А II – 271, из них: норм. -259 -95,57%, с нарушениями (асинхронные) - 12 – 4,43%. Однако, такие нарушения процессов мейоза являются нормой для злаков.

Клеток диад – 110, из них: норм. -110 - 100%, с нарушениями – 0.

Клеток М II – 171, из них: норм. -171 - 100%, с нарушениями - 0.

Клеток тетрад – 323, из них: норм. - 323 - 100%, с нарушениями - 0.

Г-18. Низкий уровень МЭД. При низком уровне МЭД ткани цветка хорошо окрашены, но пыльники – стерильные. Наблюдали крупные, красивые пыльцевые зерна, почти все стерильные, но цитоплазма и ядра в клетках есть (рис. 1). Пыльцевые зерна были крупными и мелкими. Фертильные пыльцевые зерна здесь слабо окрашенные, а ткани пыльников – стерильные – слой клеток тапетума отсутствует.



Рис. 1. Стерильные пыльцевые зерна у вида *Agropyron cristatum*

Цветков в колосках практически нет, есть только кроющие чешуи, а внутри пусто – ни завязей, ни пыльников нет.

Фертильных пыльцевых зерен незначительное количество – 1,5%, а стерильных – 98% (см.

табл.). Возможно, здесь как раз и наблюдается действие физических особенностей разных видов ионизирующих излучений, дающих разную микрогеометрию энергии в клетке и в первую очередь разную линейную потерю энергии. Кроме того, играют роль и видовые и генотипические различия в системе естественной защиты.

Г-16. Средний уровень МЭД. При среднем уровне МЭД наблюдали фертильные и стерильные пыльники, в последних не было клеток МКП (материнские клетки пыльцы), а клетки тапетума нормальные, хорошо окрашенные, двуядерные. В клетках метафазы I насчитывали 12 бивалентов, были и открытые биваленты. В клетках анафазы I насчитывали по 7+7, 8+8 хромосом. Клетки анафаз I были нормальные и с нарушениями: отстают по 1 униваленту или по 2 унивалента (рис. 2–6).



Рис. 2. Клетки анафазы I и диад с микродрамами у вида *Agropyron cristatum*



Рис. 3. Клетки анафазы I у вида *Agropyron cristatum*



Рис. 4. Клетка анафазы I
у вида *Agropyron cristatum*



Рис. 5. Зрелые пыльцевые зерна
у вида *Agropyron cristatum*



Рис. 6. Клетки метафазы I и анафазы I
у вида *Agropyron cristatum*

Из 550 клеток в стадии анафазы I, нормальных клеток было – 510 - 92,73%, с нарушениями – 40 - 7,28%.

Из 633 клеток диад нормальных было – 629 – 99,37%, с микроядрами - 4 – 0,63%.

Фертильные пыльцевые зерна были слабо окрашенные, с вмятинами и нормальной формы. В фертильных пыльцевых зернах есть плазмолиз. Стерильные пыльцевые зерна – сильно деформированные. Фертильных пыльцевых зерен с плазмолизом было 1136 – 100%. Стерильных – 0. При этом уровне МЭД количество фертильных пыльцевых зерен возрастает до 36%, а стерильных – снижается до 64%. (см. табл.). Подобное явление пока не поддается объяснению.

Г-13. Высокий уровень МЭД. При высоком уровне МЭД наблюдали очень маленькие пыльники, совсем крошечные, и в них, в основном, зрелые пыльцевые зерна – фертильные, хорошо окрашенные, но практически во всех пыльцевых зернах идет плазмолиз. Есть также и стерильные пыльники, без пыльцевых зерен – просто пустые оболочки. Кроме того, идет также недоразвитие цветков в колосках – практически их нет, только есть кроющие чешуи, а завязи и пыльники внутри отсутствуют.

В некоторых достаточно хорошо развитых пыльниках есть также анафазы I, анафазы II, тетрады.

AI – нормальных – 81 клетка – 100%, AII – нормальных – 31 клетка – 96,87%, с нарушениями (со сгустками хромосом) – 1 клетка – 3,13%. Общее количество клеток – 32.

Клетки тетрад – 1249 – все были нормальными, нарушений нет (рис. 7–10).

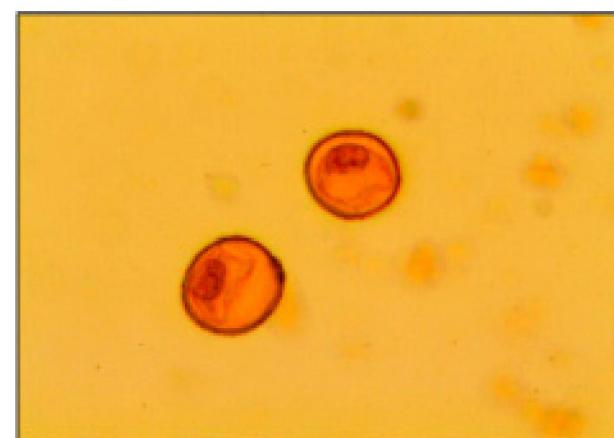


Рис. 7. Фертильные пыльцевые зерна с плазмолизом
у вида *Agropyron cristatum*

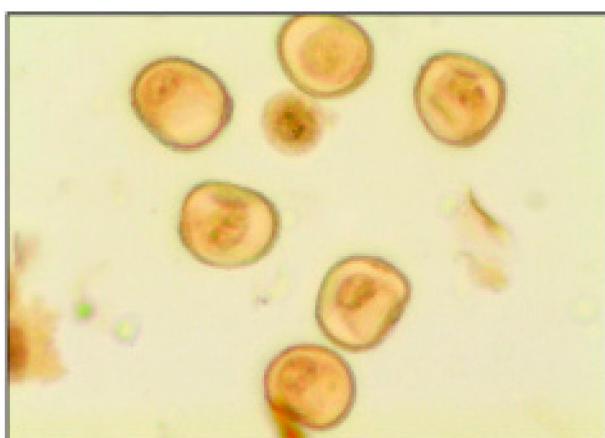


Рис. 8. Стерильные пыльцевые зерна с плазмолизом у вида *Agropyron cristatum*

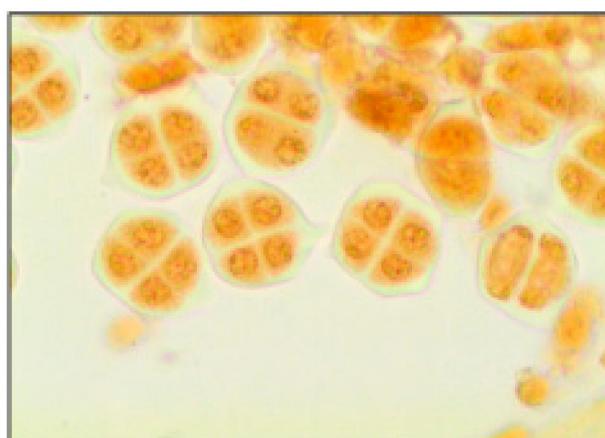


Рис. 9. Клетки тетрад у вида *Agropyron cristatum*

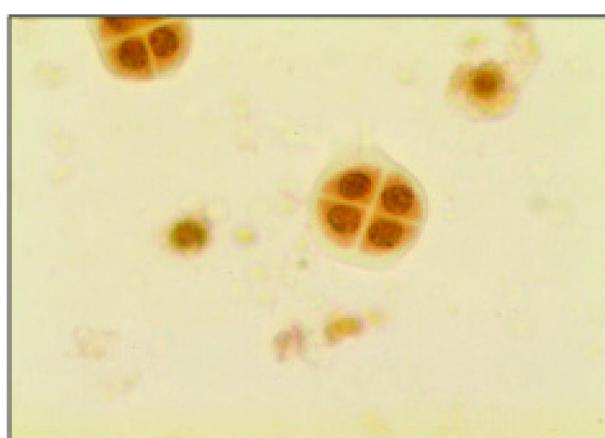


Рис. 10. Клетка тетрады у вида *Agropyron cristatum*

Фертильных пыльцевых зерен здесь 98%, а стерильных – 2% (см. табл.). Такое, на наш взгляд, аномальное явление, также, скорее всего, обусловлено действием физических особенностей разных видов ионизирующих излучений, дающих разную микрогоemetрию энергии в клетке и в первую очередь разную линейную потерю энергии, но еще, по нашему глубокому убеждению, играют роль как видовые, так и, особенно, генотипические различия в системе естественной защиты.

Таким образом, на основании проведенных исследований, можно предположить, что вид *Agropyron cristatum*, во-первых, является генетически устойчивым к видам ионизирующего излучения, а, во-вторых, что при высоких уровнях МЭД, все попадающие на такие участки семена растений просто погибают, и следующей весной происходит занос семян этого вида с других площадок и растут уже другие генотипы. Генотипы же видов растений обладают разной устойчивостью к действиям внешних факторов. Однако можно также предположить, что генотипы растений *Agropyron cristatum* были разными по составу генов, отвечающих за адаптивность растений к стрессовым условиям среды, т.е. здесь растет популяция растений вида *Agropyron cristatum* с разными генотипическими признаками, и не только по адаптивности растений, но и по другим признакам. Скорее всего, здесь, да и у других растений, под действием ионизирующего облучения и других сопутствующих факторов, идет накопление каких-то новых признаков в так называемом «фенотипическом окне генома», что относится уже к области исследований эпигенетики.

Можно также предположить, что как раз идет эпигенетический контроль адаптивных признаков растений, но в таком случае, для изучения этого явления, выборка из популяции должна быть значительной, а исследования должны включать в себя как изучение морфологических и видовых признаков вида *Agropyron cristatum* в растительной популяции, так и биохимическое, цитогенетическое, биоинформационическое изучение.

ВЫВОДЫ

1. Лимитирующими факторами для развития растений и восстановления естественного растительного покрова на площадках бывшего Се-

семипалатинского ядерного полигона являются разные виды ионизирующих излучений, а также отсутствие воды.

2. Вид *Agropyron cristatum* (L.) Beauv. является устойчивым к стрессовым условиям площадок бывшего Семипалатинского ядерного полигона.

3. Созревания семян у вида *Agropyron cristatum* (L.) Beauv. при средних и высоких уровнях МЭД не происходит, вследствие недостаточного развития или гибели мужского и женского гаметофитов в цветках растений.

4. При средних и высоких уровнях МЭД происходит, вероятно, ежегодное обновление растительного покрова злаковых растений, за счет заноса жизнеспособных семян из других районов произрастания исследуемого вида *Agropyron cristatum* (L.) Beauv.

5. У вида *Agropyron cristatum* (L.) Beauv., под действием ионизирующего облучения и других сопутствующих факторов, идет накопление каких-то новых признаков в так называемом «фенотипическом окне генома».

6. Генотипические различия в системе естественной защиты вида играют, несомненно, главную роль в процессах восстановления естественного растительного покрова бывшего Семипалатинского ядерного полигона.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дубинин Н.П. Общая генетика. М.: Наука, 1976. 590 с.
2. Ипатьев В.А. Радиоэкологический «феномен» леса // Лес в жизни восточных славян от Киевской Руси до наших дней // Сборник научных трудов. Гомель, 2003. Вып. 57. С. 155-156.
3. Самошкин Е.Н., Глазун И.Н. О вариабельности посевных качеств семян сосны в течение последних 11 лет после аварии на ЧАЭС // Селекция, генетические ресурсы и

сохранение генофонда лесных древесных растений (Вавиловские чтения): сборник научных трудов. Гомель, 2003. Вып. 59. С. 239-242.

4. Ратников А.Н., Жигарева Т.Л., Попова Г.И., Петров К.В., Шаповалов В.Ф. Влияние агромелиоративных мероприятий на урожайность сельскохозяйственных и кормовых культур и накопление цезия-137 // Бюллетень ВИУА. 2002. № 116. С. 496-499.

5. Коньков В.В., Рудаковская Л.В. Опыт создания лесных культур различными способами на радиоактивно загрязненных сельскохозяйственных землях // Проблемы лесоведения и лесоводства: сборник научных трудов. Гомель, 2003. Вып. 56. С. 23-31.

6. Жигарева Т.Л., Ратников А.Н., Алексахин Р.М., Попова Г.И., Петров К.В., Белоус Н.М., Куриленко А.Т. Влияние технологических приемов возделывания сельскохозяйственных культур на накопление ^{137}Cs в урожае // Агрохимия. 2003. № 10. С. 67-74.

7. Глазун И.Н., Алешин И.В. Посевные качества семян ели европейской и радиоактивно загрязненных насаждениях Брянской области // Селекция, генетические ресурсы и сохранение генофонда лесных древесных растений (Вавиловские чтения). Сборник научных трудов. Гомель, 2003. Вып. 59. С. 189-192.

8. Гончарова Н.В. Дикорастущие растения – биоиндикаторы экологических последствий аварий на Чернобыльской АЭС для флоры // Природные ресурсы. 2000. № 4. С. 84-88.

9. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. 2-е изд., переработ. М.: Колос, 1978. 179 с.

Резюме

Еркек билдайтын *Agropyron cristatum* (L.) Beauv. тозаң түйірінің пайда болу жөніндегі зерттеу нәтижелері келтірілген. Тозаң түйірлерінің пайда болу жолына радиация, сонымен бірге судың тапшылығы да өсер етуі мүмкін.

Summary

In present paper data of study forming pollen grains *Agropyron cristatum* (L.) Beauv. are adduced. It was placed, radiation and drying habitats in period forming of male gametophyte influenced on processes forming pollen grains *Agropyron cristatum* (L.) Beauv.